1960

INSTITUTO DE MICOLOGIA — UNIVERSIDADE DO RECIFE

PUBLICAÇÃO N.º 238

PESQUISAS MICROBIOLÓGICAS SÔBRE AMOSTRAS DE AÇÚCAR DEMERARA

A. CHAVES BATISTA

E

J. AMÉRICO DE LIMA

1960

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
1 SEP

PESQUISAS MICROBIOLÓGICAS SÔBRE AMOSTRAS DE AÇÚCAR DEMERARA

A. CHAVES BATISTA
E
J. AMÉRICO DE LIMA

Instituto de Micologia — Recife

With the Compliments of Chaves Batista

O presente trabalho tem como finalidade comunicar os resultados de pesquisas realizadas sobre a microflora existente em amostras de açúcar demerada, considerado «infectado». Essas amostras, provenientes de Pernambuco, traduzindo produto de má qualidade, mereceram a atenção da Cooperativa dos Usineiros de Pernambuco Ltd.ª, que se interessou, junto ao Instituto de Micologia, da Universidade do Recife, para que as estudasse, a fim de serem tomadas as providências capazes de assegurar a continuidade da produção de demerara do melhor tipo.

Desde algum tempo, vem-se observando que o açúcar demerara, obtido de algumas Usinas pernambucanas, como soe acontecer em outras regiões produtoras, apresenta condições anormais, em certas partidas. Tais anormalidades se caracterizam por odor pronunciadamente alterado, quase acético, consistência mais ou menos grumosa e coloração irregular, por vezes heterogénea. O material de ensacagem, em tais casos, apresenta-se, também, manchado e, não raro, pouco resistente. Trata-se, assim, de um problema de relevância para a economia do País, de vez que o açúcar demerara sofre desvalorização comercial, afastando-se das exigências-padrão dos importadores, no comércio internacional.

O estudo das amostras recebidas confirmou as alterações comprometedoras acima referidas, além de modificações na consistência do produto. Conservadas em frascos, nelas

destacavam-se manchas brancas, mais ou menos circulares, perfuradas, como efeito de prováveis fermentações por fungos e bactérias (Fig. 1); a película de mel envoltora dos cristais fora transformada em produtos secundários e o gás carbônico, por sua expansão, seria a causa das citadas perfurações na massa do açúcar.

Tais amostras tinham o pH de 5,5 e umidade de 3 %.

As pesquisas microbiológicas foram conduzidas sob diluição e por implantação de cristais de açúcar sobre diferentes meios artificiais de cultivo.

A técnica de diluição consistiu no preparo de soluções, a 2 %, do açúcar «infectado», para a suspensão em água destilada, esterilizada, dos microorganismos acaso existentes sobre os cristais de açúcar.

Desse soluto foi tomado 0,1 ml. para placas de petri, segundo a rotina usual e transvasado sobre ele o meio de cultivo, à temperatura de 45° C. Numerosas colônias desenvolveram-se, a partir de 48 horas, como representativas de bactérias e de fungos, as quais corresponderam aos mesmos organismos isolados com a implantação directa dos cristais de açúçar, na superfície dos meios de cultura, no laboratório.

Os meios de cultivo empregados abrangeram agar nutritivo, malte-agar, «mycophil-agar» e Czapek agar, em placas de petri.

A implantação dos cristais de açúcar demerara, nesses meios, procedêmo-la tomando cristais isolados, da massa de açúcar em teste, com o auxílio de uma pinça esterilizada e depondo-os, individualmente, sobre a superfície do meio, com uma leve pressão da pinça, para que ficassem parcialmente imersos no agar.

Após 48 horas, cada cristal de açúcar originou a formação de uma colônia de microorganismos, que o recobria completamente (Figs. 5-6 e 7).

Essas colônias, geralmente circulares, úmidas ou mucosas, brancas ou amarelas, variaram na frequência de seu aspecto, de acordo com o meio de cultura usado, embora indicassem, em todos os casos, um índice de infestação do açúcar de 100 %. Prevaleceram, dessa maneira, sobre «mycophil-agar», malte-

-agar e czapek-agar, as colônias de fungos leveduriformes, brancas, ao passo que sobre malte-agar e agar nutritivo predominaram as colônias bacterianas. Não foram incorporados antibióticos nesses meios de cultura.

As investigações efectuadas a partir da obtenção de culturas puras permitiram-nos o estudo e a identificação dos seguintes microorganismos:

Bactérias
Leuconostoc mesenteroides (Cienkowski) van Tieghem
Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson
Fungos
Torulopsis colliculosa (Hartmann) Saccardo
Torulopsis globosa (Olson & Hammer) Lodder & van Rij
Torulapsis dattila (Kluyver) Lodder.

Todos esses microorganismos, ora mencionados, são frequentes nos mostos açucarados, caldo de frutas, etc., excepto o *Xanthomonas oryzae,* conhecido, até então, apenas como patogéno de plantas de arroz.

O assinalamento de *Leuconostoc mesenteroides* foi de 80 % para o total de cristais de açúcar demerara implantados nos meios de malte-agar e agar nutritivo, justificando-se, desse modo, maiores considerações sobre a referida bactéria, como responsável pela danificação do produto em exame. Desde muito, é considerado o *Leuconostoc* como prejudicial à indústria açucareira, originando fermentações anormais do caldo de cana e até ensejando prejuízos de ordem mecânica, nas moendas, filtros-prensa, turbinas, etc., em virtude do grande desenvolvimento de suas colônias muco-gelatinosas, favorecido, frequentemente, pela alcalinidade do meio.

Deerr (1) cita a faculdade de *Leuconostoc mesenteroides* de converter soluções de açúcar em massas viscosas.

Segundo Browne, a goma mucilaginosa, formada durante a fermentação do açúcar e conhecida como dextrana é, provàvelmente, um produto secundário e resultante da acção do *Leuconostoc mesenteroides;* essa dextrana é, também, consti-

tutiva da cápsula que envolve as células desse microorganismo (2).

A determinação dos caracteres microbiológicos desses organismos foi executada de acordo com as normas adotadas no Bergey's Manual (3), no estudo das bactérias e, por Lodder & van Rij (4), na identificação dos fungos leveduriformes.

Estudo das Cêpas Isoladas:

Leuconostoc mesenteroides (Cienkowiski) van Tieghem.

Aos 5 dias, sobre agar nutritivo desenvolvem-se colônias branco-amarelo-creme a creme-escuras, circulares, planas, lisas, uniformes, de bordos regulares, 1-1,5 cm. de diam.

Sobre Czapek-agar, tais colônias são, inicialmente, amarelas, tornando-se cremes aos 6-7 dias de cultivo; são, igualmente, lisas, de 1,5-1,8 cm. de diam., mas apresentam bordos uniformemente enrugados, no sentido radial (Fig. 2). Crescimento restrito em batata.

Gram-positivo. Em picada sobre glucose-gelatina, cresce em torno da incisão e pouco no interior do meio; liquefacção ausente.

Sobre «sucrose-broth», produz goma mucilaginosa. Não produz indol. Não reduz nitratos a nitritos. Origina ácido de frutose, sacarose, manose, galactose, xilose, insulina, mido e rafinose. É microaerofílico.

A suas células vegetativas são em forma de cocos alongados (Fig. 3), aos pares ou agrupados, por vezes envoltas em cápsula mucilaginosa, com $0{,}8 - 1{,}2 \times 1 - 1{,}5\ \mu$.

Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson.

Aos 5 dias, sobre agar nutritivo, formam-se colônias amarelas, circulares, planas, lisas, brilhantes, uniformes, de bordos regulares, até 1 cm. de diam. As células vegetativas apresentam-se em bastonete, comumente agrupadas; gram-negativo; monótricas, isto é, móveis, com um flagelo polar (Fig. 4).

Não liquefaz a gelatina: não produz ácido sulfídrico. Não reduz nitratos a nitritos; não hidrolisa o amido; não produz indol; forma ácido, mas não gás, para glicose, lactose e sacarose. É aeróbia.

As investigações sobre os fungos leveduriformes abrangeram os estudos macro e microscópicos das colônias, além do comportamento bioquímico desses microorganismos, através de zimogramas e auxonogramas.

Todos os cultivos se desenvolveram bem, à temperatura de 29-32° C.

Estudo das Cêpas Fúngicas Isoladas:

— *Torulopsis globosa* (Olson & Hammer) Lodder & van Rij.

Cultivo em extrato de malte: aos 5 dias, anel apenas esboçado; película ausente. Células vegetativas globosas, de 2-6 μ de diam. ou ainda curto-ovais e longo-ovais, estas mais frequentes de $2 - 5 \times 3 - 8$ μ; pseudo-micélio primitivo e células do pseudo-micélio, confundindo-se com os blastosporos; sedimento presente.

Desenvolvimento sobre malte-agar: aos 5 dias, colônias cremes, pouco brilhantes, lisas, de bordos inteiros ou ondulados. Células vegetativas, na sua maioria, globosas. Também curto-ovais, ovais, longo-ovais, cilindráceas e estalagmoides; as células menores são de $1,5 - 4,5$ μ de diam.; as células mais alongadas, dispondo-se em brotação simples e múltipla, longo-ovais, cilindráceas e estalagmoideas, têm de $1,5 - 3 \times 3 - 7,5$ μ.

Cultivo sobre lâmina de batata-agar: Blastosporos globosos a ovoides, isolados e em cadeias; eventualmente pode ser notado pseudo-micélio primitivo.

Zimograma: Fermenta glucose, sacarose e maltose. Não fermenta galactose nem lactose; fermenta a rafinose, parcialmente.

Auxonograma: Assimila glucose, sacarose e maltose. Não assimila lactose, nem galactose.

Assimilação de nitrato de potássio — positiva.

— *Torulopsis dattila* (Kluyver) Lodder.

Cultivo em extrato de malte: aos 5 dias, ausência de anel e película; sedimento presente. Células vegetativas isoladas ou em cadeias: blastosporos globosos a ovais, medindo de 2 — 5 × 4 — 8 μ.

Desenvolvimento sobre malte agar: colônias cinza-creme, de bordos inteiros, ondulados, sem filamentação; superfície plana, brilhante. Blastosporos de globosos a longo-ovais, de 1,2 — 3,8 × 2,5 — 8 μ, simples ou aos pares.

Cultivo sobre lâmina de batata agar: ausência de filamentação. Células isoladas ou em brotações múltiplas, dando origem a muitas cadeias de células, de forma globosa, predominantemente.

Zimograma: fermenta glucose e sacarose: a rafinose é fermentada parcialmente. Não fermenta maltose, lactose e galactose.

Auxonograma: assimila glucose, galactose, sacarose e maltose. Não assimila a lactose.

Assimilação de nitrato de potássio — negativa.

Crescimento em etanol — nulo.

— *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Sacc.

Sin.: *Torrula colliculosa* Hartmann

Cryptococcus colliculosus (Hartman) Skinner.

Cultivo em extrato de malte: aos 5 dias, células vegetativas globosas, de 4 — 8 μ de diam., isoladas ou aos pares. Ausência de pseudo-micélio, de anel e de película; sedimento presente.

Desenvolvimento sobre malte agar: aos 5 dias, colônias branco-amareladas, lisas, brilhantes, de bordos lisos; células globosas, de 4 — 6,5 μ de diam.

Sobre lâmina de batata-agar: ausência de pseudomicélio.

Zimograma: fermenta glucose, sacarose e maltose; a rafinose é parcialmente fermentada.

Não fermenta a galactose nem lactose.

Auxonograma: assimila glucose, sacarose e maltose. Não assimila galactose nem lactose.

Assimilação de nitrato de potássio: negativa.

Não cresce sobre etanol.

Considerações: — O assinalamento dos microorganismos de que trata este trabalho, sobre açúcar demerara, põe em foco uma série de questões de natureza técnica, relacionadas, directamente, com a produção industrial e com o próprio consumo desse tipo de açúcar.

Evidentemente, é o demerara um açúcar inferior, mas de boa aceitação nos mercados internacionais, onde se destina a diferentes indústrias, pelos sub-produtos que resultam de seu beneficiamento. As exportações desse açúcar obedecem, assim, a determinada categoria de classificação, consoante os seus índices de polarização, de redutores, de umidade, de melaço. Em face da classificação, são efectuados os negócios e o produto exportado deve, então, satisfazer às exigências mínimas do comprador, de acordo com a ética comercial.

O açúcar demerara «infectado» é, dessa forma, inexportável, reflectindo-se a sua retenção em prejuízos de maior ou menor importância para o exportador.

É produto que não pode ser misturado ao demerara «sadio», porque, embora fiquem, até certo ponto, mascarados os efeitos dessa mistura, nos embarques, durante o trânsito, para mercados distantes, poderá alcançar grandes proporções a contaminação de todo o açúcar.

Por outro lado, também não deve ser distribuído para o comércio local, «in natura», pois, do ponto de vista bromatológico, o demerara «infectado» deve ser condenado pela Saúde Pública. Além das transformações bioquímicas sofridas por esse açúcar, a presença de fungos em película de mel, que reveste os cristais, pode, sob certas condições, motivar perturbações da fisiologia normal do aparelho diges-

tivo do homem e originar enfermidades da árvore biliar ou, simplesmente, do duodeno.

No curso das pesquisas realizadas no Instituto de Micologia, da Universidade do Recife, sobre Micopatologia humana, por diversas vezes têm sido isolados fungos do género *Torulopsis,* da bile humana e até do suco digestivo, incluindo-se, entre outras espécies, *T. colliculosa.*

Igualmente, e com frequência, têm sido isolados, de fezes de enfermos do aparelho digestivo, *Torulopsis dattila.* Tais achados, por si só, contraindicariam o emprego do açúcar demerara para o consumo humano.

Assim, o caminho a seguir é o retorno desse açúcar às fábricas, para tratamento e recristalização, o que envolve, indubitàvelmente, pesadíssimo onus para o produtor.

Dessa forma, importa prevenir semelhante ocorrência, evitando-se que o demerara se infecte.

Isso pode exigir providências complexas, compreendendo desde uma perfeita higienização das fábricas e de toda a aparelhagem de processamento do açúcar, incluido a embalagem final e o armazenamento, até uma pesquisa permenorizada em todas as fases de industrialização açucareira, a partir do caldo que sai das canas esmagadas nas moendas. Tal pesquisa esclarecerá como se instalam esses microorganismos no açúcar, isto é, se eles derivam de sua constante permanência em suspensão na atmosfera das usinas; se eles se introduzem no caldo das moendas, através do esmagamento das canas; se suportam a temperatura elevada dos preevaporadores e evaporadores, achando-se, assim presentes, já na massa cozida, etc.

É, sabido, por ex., que o *Leuconostoc mesenteroides* suporta, ao calor seco, 100-114° C., morrendo ao calor úmido de 87-88° C. (Owen, 5). Outros microorganismos resistem a temperaturas bem mais altas, como o *Saccharomyces zopfii,* destruído a 130-135°. Não há suficiente conhecimento, ainda, de como se comportam os *Torulopsis,* nas condições da indústria açucareira.

Walley & Scarr, citados por Owen (5), mencionam, entre os fungos leveduriformes prejudiciais ao açúcar (raw sugar),

espécies dos géneros *Zygosaccharomyces, Schizossaccharomyces* e *Torulopsis,* porém não detalham a conduta desses microorganismos nem indicam as temperaturas letais para *Torulopsis,* no domínio da indústria.

Acresce, também, a circunstância de que, teòricamente ao menos, o açúcar demerara poderá apresentar-se «infectado» por outros microorganismos, que não aqueles ora abordados, isso na dependência de factores do ambiente em que se situa uma usina, factores climáticos relacionados com as estações do ano, etc.

Impõe-se, dessa maneira, ao nosso ver, conceder assistência técnica conveniente à produção do açúcar demerara, nas fábricas, e encaminhar o produto industrializado para armazéns adequados, onde ele se conserve ao abrigo de umidade e de contaminações, para que lhe seja assegurada permanente colocação comercial, na pauta de exportações.

Summary

This report relates the microbiological studies of samples of rawtsugar produced in Pernambuco and considered as infected.

Through dilution tecnics of this sugar in distilled and sterilized water and by implanting the sugar crystals on cultivation in laboratory media, as nutritive-agar, malte-agar, mycophil-agar and czapek-agar, the following microorganisms have been isolated:

Leuconostoc Mesenteroides (Cienkowski) Van Tieghem
Xanthomonas Cryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson
Torulopsis Colliculosa (Hartmann) Sacc.
Torulopsis Globosa (Olson & Hammer) Lodder & Van Rij. and
Torulopsis Dattila (Kluyver) Lodder.

The mentioned bacteria have predominated on media of nutritive-agar and of malte-agar, while the yeasts were

steady in all tested media, prevaling on mycophil-agar and malte-agar.

The occurence of these microorganisms in the sugar samples devaluates some for the sugar refining industry and makes them useless from the bromatological point of view, as fungi of the *Torulopsis* genus have been found (in this Institute of Mycology, of the University of Recife) frequently in the bile and gastric juice of people suffering of digestive tract.

A detailed research is suggested on all sections of the sugar process, to know where and when the infections of the sugar begin, in order to take the necessary measures for the control.

Resumé

Ce repport développe les études microbiologiques des échantillons du sucre cru produit à Pernambuco et consideré comme infecté.

Par des técniques de délayement du sucre dans l'eau distillé stérilisé et par implantation des cristaux du sucre sur des milieux de cultivation en laboratoire, comme Agar--nutritive, malte-agar, mycophil agar et Czapek-agar, on a isolé les suivantes micro-organismes:

Leuconostoc mesenteroides (Cienkowski) van Tieghem
Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson
Torulopsis colliculosa (Hartmann) Sacc.
Torulopsis globosa (Olson & Hammer) Lodder & van Rij et
Torulopsis dattila (Kluyver) Lodder.

Les bactéries cités ci-dessus étaient prédominantes dans les milieux de l'agar-nutritive et de l'agar-malte, tandis que les levures étaient constantes dans tous les milieux examinés, surtout dans les milieux de mycophil-agar et malte-agar.

Le sucre qui porte ces organismes n'a pas beaucoup de valeur pour les raffineries de sucre et au point de vue

bromatologique également, puisqu'on a trouvé des levures du genre *Torulopsis* (à l'Institute de Micologie de l'Université de Recife), fréquemment chez l'homme dans la bile et dans le suc gastrique des malades de l'appareil digestif.

On suggere une recherche detaillée dans toutes les phases de la manufacturation du sucre pour savoir quand et où commencent les infections du sucre pour prendre des mesures nécessaires de contrôle.

Zuzamenfassung

Dieser Bericht behandelt die microbiologische Untersuchung von Mustern von Rohzucker der in Pernambuco produziert wird und als infiziert klassifiziert wird.

Durch technische Aufloesung des Zuckers in distilliertem und steriliertem Wasser und durch Einpflanzung der Zucker--Kristale auf die kultivierung-Media im Laboratorium, wie Nahrhaft-Agar, Malte-Agar, Mycophil-Agar und Czapek-Agar, wurden folgende Microorganismen isoliert:

Leuconostoc mesenteroides (Cienkowski) van Tieghem
Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson
Torulopsis colliculosa (Hartmann) Sacc.
Torulopsis globosa (Olson & Hammer) Lodder & van Ryj. und.
Torulopsis dattila (Kluyver) Lodder.

Die erwaehnten Bakterien waren vorherrschend in den Media der Nahrhaft-Agar und der Malte-Agar, waehrend de Yeasts staendig auf allen geprueften Media waren, ueberwiegend auf Mycophil-Agar und Malte-Agar.

Das Vorhandensein dieser Organismen im Zucker entwertet denselben fuer die Zuckerveredelungs-Industrie und macht ihn wertlos vom bromatologischen Standpunkt, da Pilze von der Torulopsis-Art (im Mycologischen Institut der Universitaet von Recife) bei Maennern gefunden wurden, haeufig

in der Galle und im Magensaft von Kranken der Verdauungsorgane.

Es wird angeregt eine detaillierte Untersuchung in allen Phasen des Zucker prozesses vorzunehmen, um festzustellen wo und wann die Infektionen des Zuckers beginnen, um entsprechende Kontrollmasnahmen vornehmen zu koennen.

BIBLIOGRAFIA

1 — Deerr, Noel — *in* Cane Sugar.
2 — ed. Norman Rodger, Lond. 566 p., 1921.

2 — Browne, C. A. — *in* A Handbook of Sugar Analysis.
Jonhn Wiley & Sons, N. Y. 584 p., 1912.

3 — Breed et al — *in* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
7 th. ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1094 p., 1957.

4 — Lodder, J. & N. J. W. Kreger — van Rij — *in* The Yeasts a Toxonomic Study.
North Holland Publ. Co. Amsterdam, 713 p., 1952.

5 — Owen, W. L. — *in* The Microbiology of Sugars Syrups and Molasses.
Burgess Publishing Company — Minnesota, 275 p., 1949.

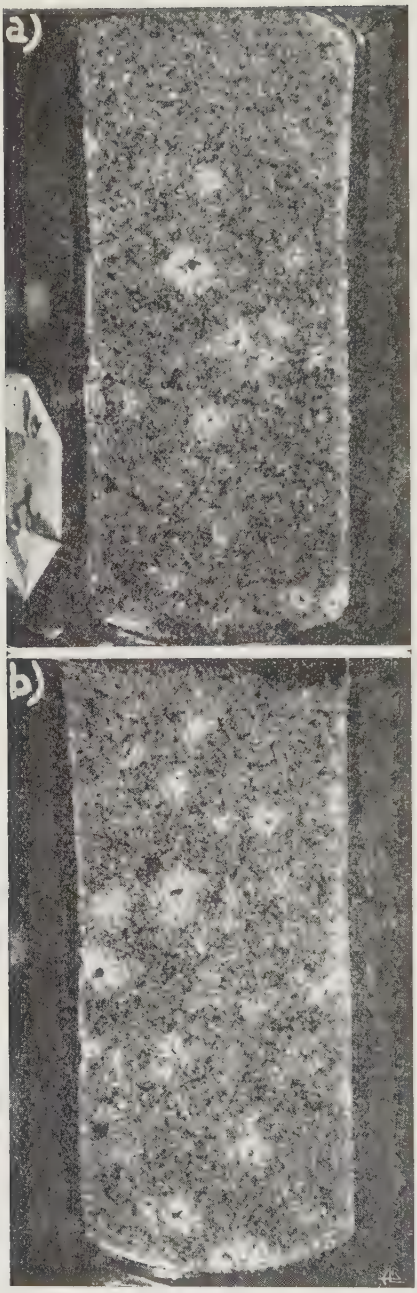

Fig. 1

Manchas brancas e perfuradas, na massa de açúcar demerara, contido em vaso de vidro.

a) Observa-se a dispersão dessas manchas, com pequenas perfurações;

b) Já são maiores as perfurações, produzidas pela expansão de CO_2.

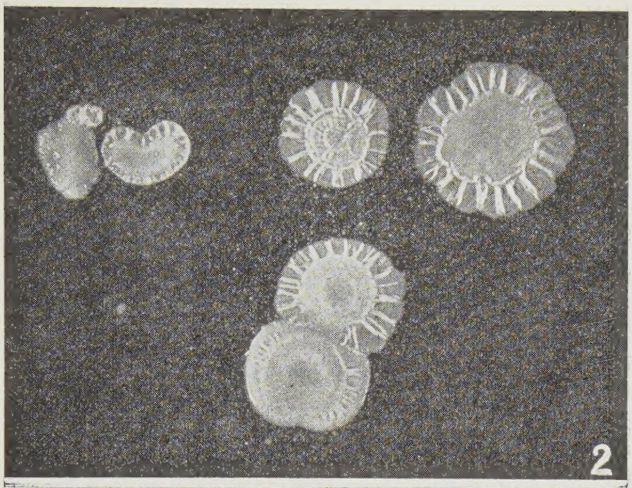

Fig. 2

Leuconostoc mesenteroides (Cienkowski) van Tieghem — Colônias sobre czapek-agar, aos 5 dias (aument.)

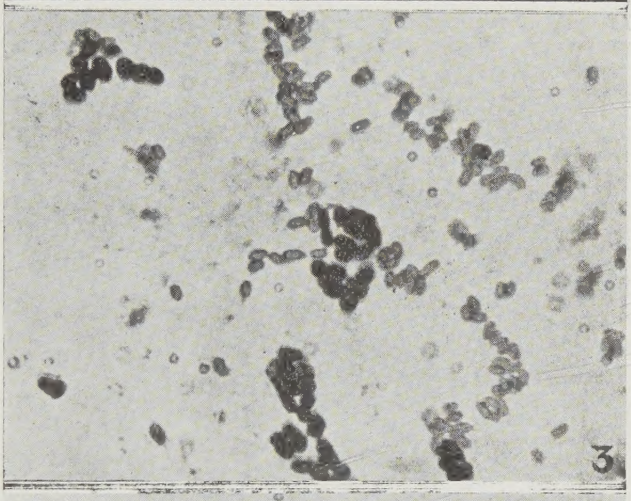

Fig. 3

Leuconostoc mesenteroides (Cienkowski) van Tieghem -- Células vegetativas.

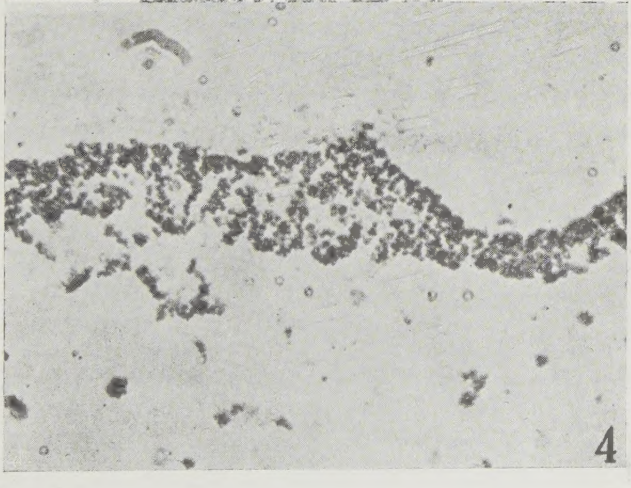

Fig. 4

Xanthomonas oryzae (Uyeda & Ishiyama) Dowson — Células vegetativas.

Colônias formadas em torno de cristais de açúcar demerara, aos 3 dias, sobre meios de cultivo artificiais

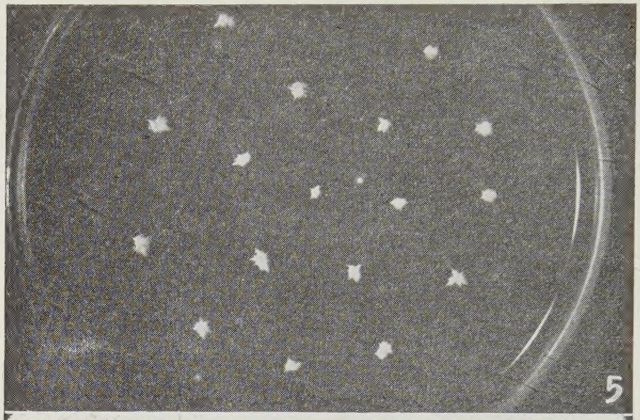

Fig. 5

Torulopsis globosa (Olson & Hammer) Lodder & van Rij — Sobre «mycophil-agar».

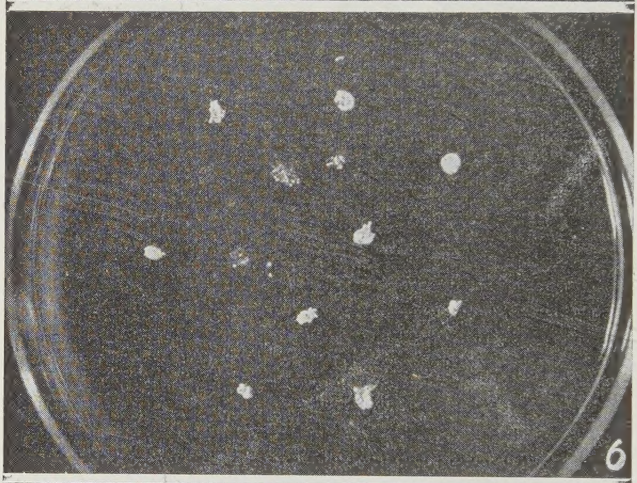

Fig. 6

Torulopsis cullículosa (Hartman) Sacc. — Sobre malte-agar.

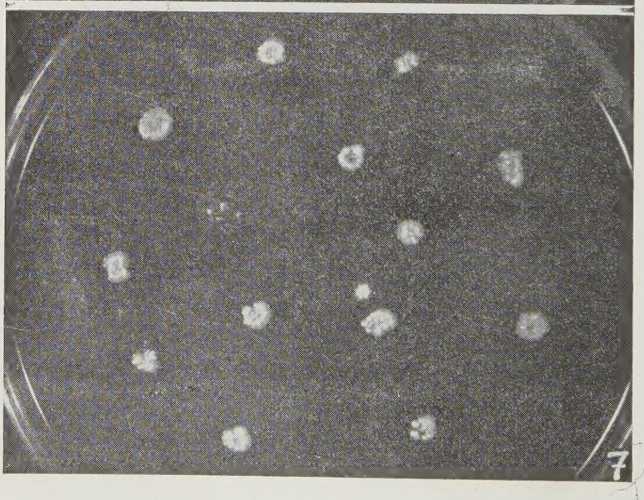

Fig. 7

Torulopsis dattila (Kluyver) Lodder — Sobre malte-agar.

Separata da Revista **BROTÉRIA**
Série de Ciências Naturais
Volume XXIX (LVI) Número 2
LISBOA 1960

Composta e Impressa no CENTRO GRÁFICO — Vila Nova de Famalicão — 1960